Aus der Klinik für Tiergeburtshilfe und Klauentierkrankheiten
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H.J. H e i d r i c h

BEITRAG ZUR EBERSPERMAKONSERVIERUNG
IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUR TIEFGEFRIERUNG SPERMAREICHER PHASEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Günther Allmeling
Tierarzt aus Hamburg

Berlin 1970
Journal-Nr. 710

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546510_0081

Aus der Klinik für Tiergeburtshilfe und Klauentierkrankheiten
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H.J. H e i d r i c h

BEITRAG ZUR EBERSPERMAKONSERVIERUNG
IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUR TIEFGEFRIERUNG SPERMAREICHER PHASEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Günther Allmeling
Tierarzt aus Hamburg

Berlin 1970
Journal-Nr. 710

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

. . . .

Vorsitzender: Prof. Dr. J. Boch
Referent: Prof. Dr. H.J. Heidrich
Korreferent: Prof. Dr. H. Niepage

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 7. 1970

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Literaturbesprechung	3
C. Eigene Untersuchungen	13
1. Material und Methodik	13
2. Versuchsanordnung	19
3. Versuchsergebnisse	22
D. Diskussion	41
E. Zusammenfassung	44
F. Literaturverzeichnis	46

A. Einleitung

Die Geschichte der künstlichen Besamung bei unseren Haustierarten geht bis ins Altertum zurück. Die wenigen darüber vorliegenden Berichte beziehen sich im wesentlichen auf Einzelfälle; erst in diesem Jahrhundert, besonders in den letzten 40 Jahren, erlangte die künstliche Besamung beim Rind in zunehmendem Maße wirtschaftliches Interesse. Sie kann heute weltweit als die Paarungsmethode der Wahl angesehen werden.

Der derzeitige Stand der künstlichen Besamung beim Rind konnte aber nur erreicht werden, weil man in der Lage war, qualitativ und quantitativ vollwertige Ejakulate zu gewinnen, für die Samenverdünnung optimal geeignete Verdünner einzusetzen und außerdem mit den modernen Methoden der Tiefgefrierung Samen bei Aufrechterhaltung der vollen Befruchtungsfähigkeit zu konservieren und über Jahre zu lagern. Somit konnte dem Wunsch des an der künstlichen Besamung interessierten Züchters, zu jeder Zeit Samen von bestimmten, anerkannten Vererbern verfügbar zu haben, entsprochen werden.

Die Entwicklung der künstlichen Besamung bei den anderen Haustierarten blieb dagegen hinter der des Rindes zurück. Sie liegt heute sogar bei einigen Tierarten noch im Stadium des Experimentierens.

Die derzeitig praktizierten Methoden in der Ebersamenkonservierung gestatten nur eine kurzfristige Lagerung der Samenportionen. Eine Verlängerung der Lagerungszeit ohne Einbuße der Befruchtungsfähigkeit des Samens wäre auch für die künstliche Besamung beim Schwein, sowohl aus der Sicht des Züchters, als auch der Wirtschaftlichkeit dieser Paarungsmethode Voraussetzung.

An der Tiefgefrierkonservierung von Ebersamen wird bereits seit mehreren Jahren experimentiert. Reproduzierbare Besamungserfolge sind bislang noch nicht zu verzeichnen.

Eine Reihe von labortechnischen Aspekten bei der Tiefgefrierkonservierung des Ebersamens bedürfen noch einer intensiven Bearbeitung.

In den vorliegenden, von Herrn Dr. ROHLOFF angeregten, in-vitro-Untersuchungen sollten spezielle Befunde beim Einfrier- und Auftauprozess von Ebersamenverdünnungen im Rahmen der Tiefgefrierung gesammelt werden.

B. Literaturbesprechung

1. Beginn der Ebersamenkonservierung

Erstmals wurde 1912 von IWANOW über erfolgreiche Schweinebesamungen berichtet. Diese Tatsache, zunächst von rein wissenschaftlichem Interesse, erbrachte den Beweis, daß auch beim Schwein eine künstliche Samenübertragung zur Konzeption führen kann. In den folgenden Jahrzehnten mehrten sich die Arbeiten über eberspermaphysiologische Untersuchungen. Doch erst seit den 50iger Jahren wurde über Ebersamenkonservierungen und Besamungsversuche in größerem Umfange berichtet. Durch den zweiten Weltkrieg waren auch unter den Schweinezuchtbeständen Europas große Lücken entstanden, die es zum Teil mit einer neuen Zuchtzielsetzung und damit verbundener Einkreuzung fremder Rassen und Schläge schnell zu schließen galt.

In Literaturstudien von HOF (1956) und ROTHE (1963) wurde die Entwicklung der KB beim Schwein eingehend besprochen, so daß im Rahmen dieser Arbeit nur ein großzügiger Überblick gegeben werden sollte.

Aus England berichtete POLGE (1956, 1959) über Besamungserfolge mit Ejakulaten, die mit Eidotter-Glukose- oder mit Eidotter-Glykokoll-Verdünnern konserviert worden waren. Zwar war in diesen Samenverdünnungen eine Spermienbewegung bis zu 12 Tagen zu beobachten, die Befruchtungsfähigkeit ließ aber bereits nach 24 Stunden deutlich nach.

In Norwegen wurde 1956 mit Schweinebesamungen begonnen. 451 Besamungen, die unter Verwendung von Eidotter-Citrat verdünntem Sperma vorgenommen wurden, erbrachten nach maximal 60-stündiger Lagerung 59,4 % Trächtigkeiten (AAMDAL u. HÖGSET, 1957).

In Japan wurde seit 1938 an den Problemen der Schweinebesamung gearbeitet (NIWA u. Mitarb., 1959; NIWA, 1961).

1959 wurden 30 000 Sauen künstlich besamt. Das Gesamtejakulat lagerte nach Gewinnung bei + 15° bis 20°C. Bei Verwendung des Samens innerhalb weniger Stunden nach der Gewinnung konnten die Ejakulate unverdünnt bleiben, während sie bei einer längeren Lagerungsdauer mit einem Eidotter-Citrat-Verdünner, unter Zusatz von Bakteriostatika, verdünnt wurden. So war eine gute Spermienbewegung für ca. 5 Tage gewährleistet. Mit 48 bis 75 Stunden gelagertem Samen wurden noch 40,0 % Trächtigkeiten erzielt.

Zwischen 1949 und 1950 wurde in Schweden mit Eberspermakonservierungen begonnen. Zufriedenstellende Konzeptionsraten konnten nur mit maximal 24 Stunden alten Samenverdünnungen erzielt werden (BANE, 1959). Zur Verwendung gelangte ein Eidotter-Citrat-Verdünner.

Ebenso wie obenstehende Autoren mußten auch MELROSE und O'HAGAN (1959) und SELF (1959), die mit Magermilchverdünnern arbeiteten, wegen des deutlichen Abfalls der Befruchtungsfähigkeit die Samenverdünnungen innerhalb von 1 - 3 Tagen nach der Konservierung verwenden.

Bei in-vitro-Untersuchungen benutzten FOOTE und Mitarbeiter (1959) einen Verdünner aus 20 % Eidotter, 0,33 % Citrat, 0,33 % Glykokoll und 1,0 % Glukose mit oder ohne Zusatz von 0,5 % Inositol und 0,15 % $NaHCO_3$ und beobachteten nach 4 Tagen noch eine durchschnittliche Spermienvorwärtsbewegung von 47 %.

ROTHE (1960) berichtete ebenfalls von in-vitro-Untersuchungen. In einem Verdünner aus 1,0 % Na-Citrat, 0,5 % Glykokoll, 0,3 % Sulfanilamid und 30 % Eidotter war noch nach 12 Tagen Lagerung im Kühlschrank eine Spermienvorwärtsbewegung vorhanden. Er weist außerdem auf eine Verbesserung der Konservierung durch Sulfanilamidzusätze hin. Der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien betrug bei einer Lagerungstemperatur von + 10°C nach 96 Stunden noch durchschnittlich 60 %.

2. Das CO_2-Inaktivierungsverfahren bei der Ebersamenkonservierung

DU MESNIL DU BUISSON (1957) benutzte zum ersten Mal die in der Bullensamenkonservierung schon erprobte CO_2-Inaktivierung für die Konservierung von Ebersperma. Unter Verwendung eines Bikarbonatverdünners konnte bei einer Lagerungstemperatur von + 15°C noch nach 8 Tagen eine Spermienvorwärtsbewegung von 40 % beobachtet werden. Seit Februar 1958 wurden dann mehr als 10 000 Besamungen mit CO_2-konserviertem Ebersperma vorgenommen, wobei ein aus der Bullensamenkonservierung bekannter, modifizierter IVT-Verdünner (VANDEMARK u. SHARMA, 1957) ohne Zusatz von Eigelb benutzt wurde. Die Konzeptionsraten lagen mit Samen vom Tag der Gewinnung bei 72,0 % und fielen bis zum 3. Tag der Lagerung um jeweils täglich 4 % ab, um dann vom 3. - 6. Tag konstant zu bleiben (DU MESNIL DU BUISSON, 1961).

KVASNITZKI (1959) und NIWA (1961) berichteten, daß auch unverdünnter Ebersamen durch CO_2-Sättigung zu konservieren sei. Auch LIESS und GROVE (1963) erzielten befriedigende Konservierungserfolge mit der CO_2-Methode, indem sie das Ejakulat unverdünnt mit CO_2 sättigten. SPREMBERG (1963) benutzte einen Verdünner aus entrahmter Frischmilch mit 10 % Eidotterzusatz. Er lagerte die Samenportionen bei + 8°C im Kühlschrank und konnte die Anfangsmotilität der Samenverdünnung für 2 - 3 Tage erhalten. Er beobachtete, daß die Lagerungstemperatur von + 15°C für die Samenkonservierung mit CO_2-gesättigten Verdünnern besser sei, als eine Kühlschranktemperatur von + 4°C.

Über in-vitro-Untersuchungen mit einem 10 %igen CO_2-gesättigten Magermilchverdünner berichteten ROHLOFF (1964) und HEIDRICH und Mitarbeiter (1964) bei Verwendung von Gesamtejakulaten und bei fraktioniert gewonnenen spermareichen Phasen. SMIDT (1964) beschrieb die keimhemmende Wirkung CO_2- gesättigter Verdünner und beobachtete nach 8-tägiger Konservierung 60 - 80 % der Eberspermien in Vorwärtsbewegung.

Zum ersten Mal in Deutschland führten EIBL und WETTKE (1964) Besamungen mit CO_2-inaktiviertem Ebersamen durch. Sie benutzten ebenfalls den IVT-Verdünner und erzielten nach Einsatz von maximal 4 Tage alten Samenverdünnungen bei 53 % der besamten Sauen Trächtigkeiten.

Obwohl die CO_2-Inaktivierung gegenüber den konservativen Konservierungsverfahren eine Verlängerung der Befruchtungsfähigkeit erbrachte, war das Verfahren mit großem Arbeitsaufwand und somit mit hohen Kosten verbunden, zumal oft nur ein geringer Teil der gefertigten Samenportionen zum Einsatz gelangte.

Um die KB beim Schwein durch maximales Ausnutzen der konfektionierten Samenportionen wirtschaftlicher zu gestalten, wurde versucht, orientiert am Sperma des Bullen (POLGE u. Mitarb., 1949;, SMITH u. POLGE, 1950; ROWSON u. POLGE, 1953), die Tiefgefrierung auch für die Ebersamenkonservierung anwendbar zu machen.

3. Eberspermatiefgefrierung

Mit zentrifugierten Eberejakulaten arbeitete ROY (1955). Er resuspendierte das Spermiensediment in einem 4,5 %igen Glykokoll-Eidotter-Verdünner. Das Volumen dieser Vorverdünnung betrug 1/10 der Gesamtejakulatmenge. Nach 10-stündiger Lagerung bei + 4°C wurde mit dem gleichen Verdünner, der jetzt jedoch 20 % Glycerin enthielt, auf die doppelte Menge weiterverdünnt. Nach einer Glycerinanpassungszeit von 16 Stunden bei + 4°C wurde die Verdünnung auf - 79°C eingefroren. 24 Stunden nach dem Einfrieren wurden die Samenportionen aufgetaut und zeigten 50 % der Spermien in Vorwärtsbewegung.

POLGE (1956) versetzte das Gesamtejakulat mit einem 25 % Dotter enthaltendem 2 %igen Glukose- oder Glykokollverdünner im Verhältnis 1 : 1. Diese Samenverdünnung wurde auf + 15°C bis + 10°C vorgekühlt, um dann mit dem gleichen, jetzt

Glycerin enthaltenden Verdünner so nachzuverdünnen, daß eine Glycerinendkonzentration von 8 - 10 % erreicht wurde. Nach 2 bis 3-stündiger Lagerung wurde die Samenverdünnung in Glasampullen abgefüllt und auf - 79°C herabgefroren. Die Auftaurate vorwärtsbeweglicher Spermien betrug 25 %. POLGE stellte fest, daß eine Glycerinkonzentration von 10 %, obwohl einen optimalen Gefrierschutz bietend, sich nachteilig auf die Beweglichkeit der Spermien auswirkte.

1958 berichtete SETTERGREN von sehr umfangreichen Untersuchungen über Verdünner, Glycerinkonzentrationen, Verdünnungsgrade, Anpassungszeiten, Konfektionierungsmöglichkeiten und Einfriergeschwindigkeiten. Trotz hervorragender Auftauergebnisse konnten Sauen nicht mit Erfolg besamt werden. Die besten Auftauergebnisse erzielte er bei Verwendung von Gesamtejakulaten, die er mit einer 3 - 4 %igen Glykokoll- bzw. 5 %igen Glukoselösung und 25 % Dotter bis auf die Hälfte des endgültigen Verdünnungsvolumens vorverdünnte. Nach Abkühlung auf + 5°C wurde nochmal die gleiche Menge glycerinhaltiger Verdünner hinzugesetzt. In der fertigen Samenverdünnung betrug die Glycerinkonzentration 7 - 10 %. Eine 10 %ige Glycerinendkonzentration erwies sich als optimal. Nach 12 bis 24-stündiger Anpassungszeit wurde die Verdünnung in dünnwandige Spermaröhrchen mit einer Länge von 4 - 20 cm und einem Fassungsvermögen von 1 - 15 ml abgefüllt und mit einer Gefriergeschwindigkeit von 1° - 3°C/min auf - 75°C langsam herabgefroren. Sturzkühlungen ergaben deutlich schlechtere Ergebnisse.
In nach dieser Methode eingefrorenen und aufgetauten Samenverdünnungen konnten 50 - 60 % bewegliche Spermien beobachtet werden. Die Auftauergebnisse von Samenverdünnungen, von gleichen Ebern stammend, zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse.

SETTERGREN (1958) glaubte, daß durch eine 10 %ige Glycerinkonzentration, die einen guten Gefrierschutz bot, die Wurfgrößen stark vermindert werden. Besamungen mit zur Tiefge-

frierung vorbereiteten Samenverdünnungen, die 8 - 10 % Glycerin enthielten, erzielten bei 2 von 3 Sauen Trächtigkeiten mit Wurfgrößen von 2 bis 3 Ferkeln; Kontrollversuche mit verdünntem Frischsamen vom gleichen Eber ohne Glycerinzusatz erzielten bei 21 Besamungen 16 Trächtigkeiten mit 10 Ferkeln bei Alt- und 6 Ferkeln bei Jungsauen.

Nach der gleichen Methode wie SETTERGREN arbeitete BANE (1959). Er verwendete jedoch Glykokoll-Dotter bzw. Glukose-Dotter-Verdünner, wobei beide Medien 8 -10 % Glycerin enthielten. Die Verdünnung betrug 1 : 6 bis 1 : 9. Auch er beobachtete, wie SETTERGREN, starke Schwankungen der prozentualen Überlebensrate nach dem Auftauen.

WERKMANN berichtete 1959 von dem Los Banos Breeding Center College über Tiefgefrierversuche. Die Eber wurden durch Elektroejakulation entsamt. Das Ejakulat wurde zentrifugiert, die sedimentierten Spermien auf 20 % der ursprünglichen Ejakulatmenge mit einem 4 %igen Glykokoll-Eidotter-Verdünner resuspendiert. Die Verdünnung wurde auf + 5°C abgekühlt und anschließend mit 25 % Glycerin, welches innerhalb von 2 Stunden fraktioniert hinzugegeben wurde, versetzt. "Über Nacht" blieb die Samenverdünnung im Kühlschrank stehen und wurde am folgenden Morgen langsam mit 1°C/min auf - 79°C eingefroren. Nach zwölfwöchiger Lagerung bei - 79°C konnte noch eine Vorwärtsbeweglichkeit von durchschnittlich 44 % beobachtet werden.

Auch HESS und Mitarbeiter (1960) beschäftigten sich mit dem Einfluß des Einfrierens auf den prozentualen Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien und deren Bewegungsqualität nach dem Auftauen. Danach nimmt mit zunehmender Einfriergeschwindigkeit die Spermienmotilität ab. Eine Lagerungstemperatur von - 23°C ist für die Überlebensrate schlechter als Temperaturen von - 72°C oder - 95°C. Glycerinanpassungszeiten von 0, 4 oder 24 Stunden erbrachten keine unterschiedlichen Auftauergebnisse. Ähnliche Untersuchungen stellten NIWA und

Mitarbeiter (1962) an. Die besten Auftauergebnisse erzielten sie durch Einfrieren von Nebenhodenschwanzspermien. Der Samen wurde in 10 Stunden auf + 5°C abgekühlt, Glycerin hinzugegeben, so daß eine Glycerinendkonzentration von 7 % herrschte, für 6 Stunden bei + 5°C äquilibriert und dann eingefroren. Die Temperaturabsenkungsgeschwindigkeit betrug von + 5°C auf - 10°C 1/2°C/min, von - 10°C auf - 30°C 5°C/min und von - 30°C auf - 79°C 5 bis 10°C/min. Der kritische Temperaturbereich lag nach Ansicht der Autoren zwischen - 10°C und - 30°C. Unter den beschriebenen Bedingungen konnten nach dem Auftauen maximal 60 % bewegliche Spermien beobachtet werden.

DUKELOW und GRAHAM (1962) verdünnten die Eberejakulate mit erhitzter, homogenisierter Vollmilch unter Zusatz von 7 % Glycerin. Optimale Konservierungsergebnisse hatten sie bei einer Glycerinanpassungszeit von 4 Stunden und einer Einfriergeschwindigkeit von 2°C/min von + 4°C bis - 42°C und 5°C/min von - 42°C bis - 79°C. Diese Methode war einem schnelleren Einfrieren überlegen. Unterschiedliche Verdünnungen von 30 x 10^6 oder 60 x 10^6 Spermien /ml wirkten sich nicht auf die Auftauergebnisse aus. Die Autoren stellten fest, daß ein Zusatz von 5 - 7 % Glycerin günstiger sei, als ein Anteil von 15 - 20 %.

BADER (B., 1964) prüfte Glukose-, Glykokoll-, Natriumcitrat-, Milch-Spermasol-, Laiciphos- und Molico-Verdünner auf Verwendbarkeit zur Ebersamentiefgefrierung. Es wurde bei allen Verdünnern mit 30 % Eidotter und Glycerinanteilen von 6, 8, 9, 10, 20, 30 % gearbeitet. Gesamtejakulate, spermareiche Phasen und zentrifugierte Ejakulate wurden verdünnt und mit 1°C/min auf - 79°C tiefgefroren. Lediglich beim Glukose- und Milch-Spermasol-Verdünner konnten 30 % bzw. 20 % vorwärtsbewegliche Spermien beobachtet werden. Die optimalen Glycerinkonzentrationen lagen unter 10 %.

BADER (H., 1964) bediente sich bei Tiefgefrierversuchen von Ebersamen acht unterschiedlicher Abkühlungsmethoden und unterzog drei Verdünnermedien (Glukose, Glykokoll und Glukose-Tris-Citrat) einer vergleichenden Betrachtung. Außerdem wurde der pH-Wert in den Samenproben untersucht. Die besten Auftauergebnisse gab es in Glukose-Tris-Verdünnern nach einer Abkühlgeschwindigkeit von 1/6°C/min im Temperaturbereich von + 5°C bis - 15°C, 1°C/min zwischen - 15°C und - 25°C, sowie 5°C/min zwischen - 25°C und - 79°C. Schlechtere Ergebnisse brachten Sturzkühlungen; pH-Wertverschiebungen waren in den Proben während 30-tägiger Lagerung bei - 92°C nicht zu erkennen. Ferner wies BADER (H.) darauf hin, daß beim Einfrieren von 1 ml-Samenportionen die Auftauergebnisse besser waren als nach Einfrieren von 10 ml-Samenportionen.

Auch KING und MCPHERSSON (1966) setzten sich eingehend mit Methoden der Eberspermatiefgefrierung auseinander. Sie benutzten zur Verdünnung der spermareichen Phase sowohl Magermilch-Eidotter-Glukose- als auch Eidotter-Phosphat-Glukose-Medien. Die Untersuchungen ergaben, daß eine Vorkühlzeit von 4 Stunden auf + 5°C optimal ist. Eine 2 - 6-stündige Glycerinanpassungszeit war sehr viel günstiger als eine 18-stündige. Die Kühlgeschwindigkeit A von 1°C/min zwischen + 5°C und - 10°C, 2°C/min zwischen - 10°C und - 17°C und 4°C/min zwischen - 17°C und - 79°C und dem anschließenden Verbringen der Proben in flüssigen Stickstoff war der Kühlgeschwindigkeit B weit unterlegen. Bei B wurde mit 1/2°C/min von + 5°C auf - 10°C, mit 1°C/min von - 10°C bis - 25°C und mit 5°C/min von - 25°C auf - 79°C herabgefroren. Dabei war es gleichgültig, ob die 1 ml-Glasampullen, 0,8 ml-Pailletten oder 8 ml fassenden Polyaethylenschläuchen eingefroren wurde. Glycerinanteile zwischen 7 % und 9 % waren in ihrer Gefrierschutzfunktion Konzentrationen von 5 % überlegen, wobei unterschiedliche Methoden der Glycerinbeigabe zum Verdünner keine signifikanten Unterschiede der Auftauergebnisse brachten. Ferner wurde der osmotische Druck in einem Eidotter-Phosphat-Glukose-Verdünner durch unterschiedliche Glukoseanteile

zwischen 280 und 420 milliosmol variiert. Änderungen der Glukoseanteile zwischen 2 % und 4 % brachten keine deutlichen Unterschiede in der Überlebensrate der Spermien. Ebenso wurde der pH-Wert in beiden Verdünnern durch Zusatz von Phosphat-Puffer nach SÖRENSEN variiert. Das pH-Optimum lag zwischen 6,7 und 7,0.

Sehr gute Auftauergebnisse erzielte ROHLOFF (1967) mit der von NAGASE und NIWA (1963, 1964) beschriebenen Methode. Ebersamenverdünnungen wurden auf Trockeneisformen als Pellets eingefroren. Die besten Auftauergebnisse wurden unter Verwendung eines Tris-Verdünners nach FOOTE erzielt. Die spermareiche Phase wurde fraktioniert gewonnen und mit dem 8 % Glycerin enthaltenden Verdünner im Verhältnis 1:1 bzw. 1:2 bei Zimmertemperatur verdünnt. Glycerinanpassung erfolgte während der kontinuierlichen Abkühlung von + 24°C auf + 5°C in einer Kühltruhe. Anschließend wurde pelletiert, und die Pellets sofort in flüssigen Stickstoff verbracht. Mit dieser Methode konnten nach dem Auftauen bis zu 50 % der Spermien in guter Vorwärtsbewegung beobachtet werden. ROHLOFF wies darauf hin, daß sich Ejakulate einzelner Eber unterschiedlich gut oder gar nicht einfrieren lassen.

GROVE und Mitarbeiter (1968) konservierten Spermien, die sie nach Kastration der Eber aus den Nebenhoden gewannen. Die Spermien wurden in zwei Phasen mit einem Tris-Verdünner verdünnt. Der Vorverdünner bestand aus der Stammlösung und Dotter; 15 Minuten später erfolgte die Nachverdünnung mit Stammlösung, Dotter und Glycerin. Die Glycerinendkonzentration betrug 4,0 bzw. 3,2 %. Nach einer Anpassungszeit von 2 - 3 Stunden im Kühlschrank bei + 5°C wurde auf Trockeneis pelletiert. Der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien betrug nach dem Auftauen in einer 5 % Glukose und 1 % Fruktose enthaltenden Vorlage zwischen 40 % und 50 %.

HESS und Mitarbeiter (1957) berichteten erstmals von erfolgreichen Besamungsversuchen mit tiefgefrorenem Ebersamen. Sie

verdünnten das Gesamtejakulat nach Entfernung der Bulbourethralsekrete mit einem Glukose-Eidotter-Verdünner im Verhältnis 1 : 4. Nach Abkühlung auf + 6°C bis + 5°C wurde eine nicht näher angegebene Menge Glycerin zugesetzt, langsam auf - 75°C abgekühlt und in eine Tiefkühltruhe von - 95°C umgesetzt. Das Auftauen erfolgte bei + 5°C. Von 25 besamten Sauen wurden 6 nach einmaliger und eine Sau nach zweimaliger Besamung tragend.

HOFFMANN (1959) besamte 11 Sauen und erzielte eine Trächtigkeit mit 9 Ferkeln. Er verwendete zentrifugierten Ebersamen (10 min bei 5 - 7000 U/min), der mit einem 3 %igen Glukoseverdünner mit Zusätzen von 25 % Eidotter und 9 % Glycerin verdünnt war. Die Samenverdünnung wurde ohne Anpassungszeit nach Abkühlung auf + 5°C eingefroren. Die Gefriergeschwindigkeit betrug von + 5°C bis - 79°C 1°C/min. Der Auftauprozeß erfolgte zunächst in Eiswasser bei + 4°C, später wurde auf + 38°C erwärmt.

Mit geringgradig geänderter Methode arbeitete BAIER (1962). Im Gegensatz zu HOFFMANN wurden die fraktioniert gewonnenen Ejakulate 10 Minuten mit 5 - 7000 U/min zentrifugiert. Die Samenverdünnung wurde in 50 bzw. 100 ml Glasflaschen oder Polyaethylenbeutel abgefüllt und wie bei HOFFMANN eingefroren. Von 26 besamten Sauen wurden zwei Sauen nach einmaliger und eine Sau nach zweimaliger Besamung trächtig. Die Wurfzahlen betrugen 5, 11 bzw. 10 Ferkel.

C. Eigene Untersuchungen

1. Material und Methode

a. Samenspender

Als Samenspender standen 8 Eber im Alter von 1 1/2 - 5 Jahren zur Verfügung. 6 Eber waren durch vorangegangene Arbeiten an dieser Klinik als gute "Konservierer" bekannt.

Tabelle 1

Eber-Nr.	Rasse	Alter
4	Pietrain-Bastard	5 - 6 Jahre
8	Deutsche Landrasse	4 - 5 "
9	" "	4 - 5 "
14	" "	3 - 4 "
15	Pietrain-Bastard	1 - 2 "
16	" "	1 - 2 "
17	" "	1 - 2 "
18	" "	1 - 2 "

Die Eber 8 und 9, sowie 15 - 18 waren jeweils Wurfgeschwister. Nr. 15 und Nr. 18 wurden nur vereinzelt zu den Versuchen herangezogen.

b. Samenentnahme

Die Eber wurden zweimal wöchentlich entsamt. Der Sprungplatz mit dem Phantom vom Typ "Berliner Modell" befand sich im Eberstall, nur durch eine halbhohe Wand von den Eber-

buchten getrennt, so daß der Sprung des ersten Ebers bereits als akustisches Stimulans auf die übrigen wirkte, was den gesamten Arbeitsgang des Entsamens stark beschleunigte. Die sexuelle Stimulierung der Eber war so gut, daß das Phantom von allen Ebern ohne langes Vorspiel besprungen wurde. Die Entsamung erfolgte durch manuelles Fixieren des Penis. Die Ejakulate wurden in vorgewärmten und mit Zellstoff isolierten Glasgefäßen fraktioniert, also spermareiche Phase und Restejakulat voneinander getrennt, aufgefangen.

c. Samenuntersuchung

181 Ejakulate wurden in dieser Arbeit untersucht. Die durchschnittliche Menge der für die Versuche benötigten spermareichen Phasen betrug 50 ml. Der pH-Wert der Ejakulate wurde mit einem elektrischen pH-Meter mit Einstabmeßelektrode (KNICK) gemessen. Die Spermiendichte wurde mit dem Spermiodensimeter nach KARRAS ermittelt. Zur Verdichtung der Spermienkonzentration stand eine Laborzentrifuge (CHRIST Junior 3) zur Verfügung.

d. Samenverdünnung und Konservierung

Zum Verdünnen der Ejakulate diente der von ROHLOFF (1967) für die Eberspermatiefgefrierung verwandte Tris-Verdünner nach FOOTE:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	3,028 g
Fructose	1,25 g
Zitronensäure	1,73 g
Glycerin	8,0 g
Aqua dest.	ad 100,0 ml
25 % Eidotter	
1 Mill. I.E. Penicillin	
+ 1 g Dihydrostreptomycinsulfat/ 1000 ml	

Nach vollständiger Lösung der kristallinen Bestandteile in destilliertem Wasser wurde das vom Eiweiß getrennte Dotter unter ständigem Rühren dem Verdünner hinzugefügt. Danach wurde der Verdünner durch einen Porzellanfilter gegeben, so daß die grobdispersen Teilchen des Dotters abgeschieden wurden. Das Verdünnen geschah nach vollständiger Temperaturangleichung von Samen und Verdünner im Wasserbad von 25°C. Der Verdünner enthielt den gesamten Glycerinanteil. Eine Nachverdünnung erfolgte nicht. Das Vorkühlen konnte mit Hilfe einer programmierbaren Kühltruhe (RUBARTH) sehr kontinuierlich und exakt vorgenommen werden. Da die Samenflüssigkeit bereits die gesamte Glycerinmenge enthielt, war die Vorkühlzeit gleichzeitig die Glycerinanpassungszeit. Nach Abkühlung der Samenverdünnung auf + 10°C fand eine weitere mikroskopische Beurteilung statt. Samenverdünnungen, die einen Anteil von weniger als 60 % vorwärtsbeweglicher Spermien aufwiesen, wurden aus dem Versuch genommen und verworfen. Die Samenverdünnungen von guter Qualität wurden im Zweistufenverfahren über Kohlensäureeis in flüssigem Stickstoff sturzartig auf - 196°C tiefgefroren.

Es kamen zwei Verfahren der Konfektionierung zur Anwendung:

Einfrieren in Pelletform (NAGASE u. NIWA, 1964),
Einfrieren in Stangenform (Abb. 1).

Pelletiert wurde in vorher gefertigte Trockeneisformen. Hierzu wurden in das Eis mit einem 8 mm Bohrer ca. 3 mm tiefe Löcher gebohrt, in welche mit einer Pipette je 0,2 bis 0,3 ml Samenverdünnung getropft wurde. Anschließend wurde die Form mit einer zweiten Platte abgedeckt. Es erwies sich als zweckmäßig, zwischen die Trockeneisplatten Korkscheiben zu legen, um ein Anfrieren der Pellets an der Abdeckplatte zu verhindern.

Das Verfahren, Samenverdünnungen in Stangenform einzufrieren, beruhte auf dem gleichen Prinzip wie das Pelletieren auf Trockeneis. Mit einem 8 mm Bohrer wurden 8 - 10 cm tiefe

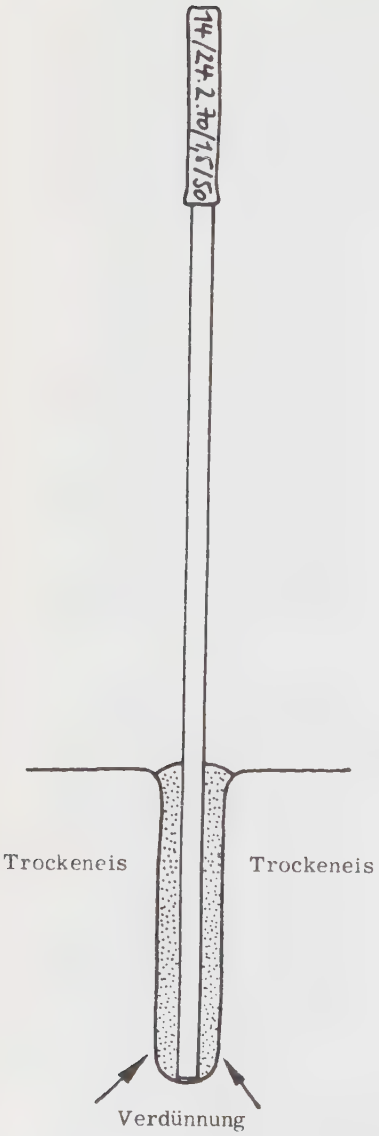

Abb. 1

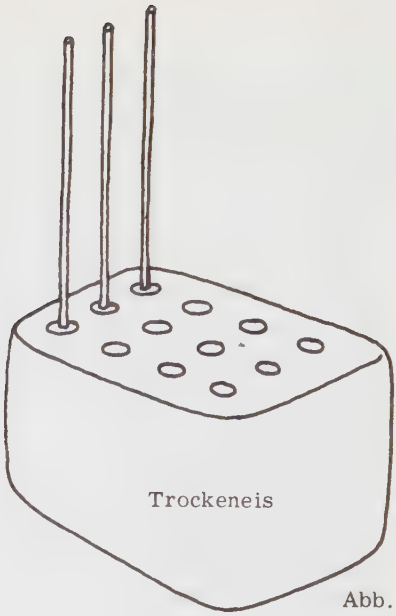

Abb. 2

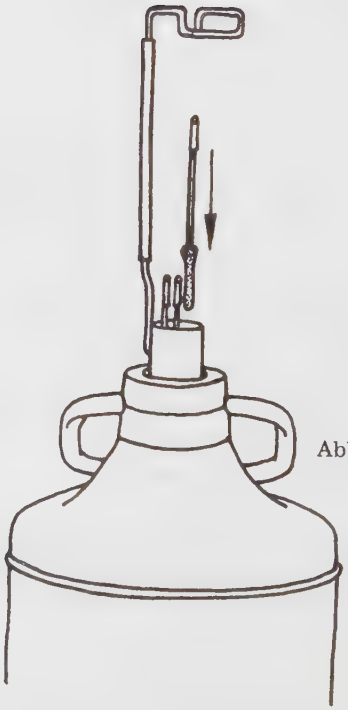

Abb. 3

Löcher in einen Trockeneisblock gebohrt. In die Löcher wurden auf - 80°C heruntergekühlte Glasröhrchen (Länge 180 mm, Ø 4 - 5 mm, Wandstärke 0,8 - 10 mm) gesteckt (Abb. 2). Um die Glasröhrchen wurden 2,5 - 4,0 ml Samenverdünnung in die Bohrlöcher pipettiert. Nach 40 - 60 Sekunden konnten die Glasröhrchen mit der daran angefrorenen Samenverdünnung aus dem Bohrloch gezogen und in flüssigen Stickstoff gebracht werden (Abb. 3).

e. Auftauen der Samenkonserven und Beurteilung

Das Auftauen erfolgte 3 - 7 Tage nach dem Einfrieren. Die Temperatur des Auftauverdünners betrug stets + 39°C. Die Pellets wurden in 0,5 - 3 ml, stangenkonfektionierter Samen in mindestens 60 ml aufgetaut.
Als Vorlagen wurden

1. Tris-Verdünner (FOOTE) ohne Glycerin
2. IVT-Verdünner (VAN DEMARK u. SHARMA, 1957)
3. IVT-Verdünner und Tris-Verdünner im Verhältnis 1 + 1
4. ultrazentrifugiertes Plasma
5. physiologische Kochsalzlösung

verwandt. Die aufgetauten Samenproben wurden mit einem auf + 39°C beheizten Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Die Beurteilung erfolgte jeweils 5 Minuten nach dem Auftauen nach folgenden Kriterien:

A. Der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien [V %] wurde geschätzt

B. Die Intensität der Vorwärtsbewegung [I] wurde beurteilt und mit Ziffern von 1 - 4 bewertet. Die Wertziffern 1 - 4 bedeuten:

1 = Die Schwanzbewegung der Spermien ist so gering, daß gerade noch eine schwache Vorwärtsbewegung zu beobachten ist. Die Bewegung ist von Phasen der Unbeweglichkeit unterbrochen.

2 = Es ist eine deutliche Vorwärtsbewegung vorhanden. Der Schwanz ist in jeder Phase seiner Bewegung klar zu erkennen. Die Vorwärtsbewegung erscheint taumelig.

3 = Die Spermien bewegen sich geradlinig und zügig.
Die einzelnen Spermien sind nicht mehr zu erkennen.

4 = Die Spermien bewegen sich geradlinig und so schnell
im Blickfeld, daß eine längere Beobachtung einzel-
ner Spermien nicht möglich ist.

2. Versuchsanordnungen

Der besseren Übersicht wegen wurden die Untersuchungen dieser Arbeit in 8 Versuchsreihen wie folgt unterteilt:

Versuchsreihe 1

Zur Untersuchung der Glycerinverträglichkeit wurden je 12 spermareiche Phasen von 4 Ebern mit 3, 5, 7 und 9 % glycerinhaltigem Tris-Verdünner 1 + 4 versetzt, als Pellets eingefroren und der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nach dem Auftauen vergleichend beurteilt. Die Verdünnung erfolgte nur in dieser Versuchsreihe bei + 35°C im Wasserbad. Die Vorkühlzeit auf + 10°C betrug 5 Stunden. Es wurde in Pellets eingefroren.

Versuchsreihe 2

Es wurden vergleichende Untersuchungen mit zentrifugierten und unzentrifugierten spermareichen Phasen angestellt. 12 spermareiche Phasen von 6 Ebern wurden geteilt, die eine Hälfte in vortemperierte 10-ml-Zentrifugengläser abgefüllt und 3 Minuten bei 2000 U/min (g = 6150) zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Plasmaüberstandes erfolgte Resuspension des Spermiensediments mit Tris-Verdünner (7 % Glycerin) im Wasserbad bei + 25°C im Verhältnis 1 + 4. Das Abkühlen auf + 10°C erfolgte in 5 Stunden. Es wurde in Pellets eingefroren.

Versuchsreihe 3

Die Vorkühlzeit von 5 Stunden wurde auf 2 1/2 Stunden verkürzt und gemessen an den Auftauergebnissen die beiden Versuchsreihen verglichen. In jeder Versuchsreihe gelangten 11 Ejakulate von jeweils gleichen Ebern zur Untersuchung. Der Glycerinanteil im Verdünner betrug 7 %. Es wurde in Pellets eingefroren.

Versuchsreihe 4

Sedimentierte Spermien von 10 Ejakulaten des gleichen Ebers wurden nach dem Zentrifugieren in Verdünnungsverhältnissen von 2 + 1, 1 + 1, 2 + 3, 1 + 2 und 1 + 3 in Tris-Verdünnern mit einem Glycerinanteil von 7 % resuspendiert. In 2 1/2 Stunden wurden die Proben auf + 10°C vorgekühlt und anschließend in Pellets eingefroren.

Versuchsreihe 5

Im Gegensatz zu Versuchsreihe 4, wo nur die Ejakulate eines Ebers konserviert wurden, konnten in dieser Versuchsreihe 30 zentrifugierte spermareiche Phasen von 3 Ebern mit dem in Versuchsreihe 4 ermittelten günstigsten Verdünnungsverhältnis (2 + 3) untersucht und als Pellets eingefroren werden.

Versuchsreihe 6

Zu einer vergleichenden Untersuchung mit 15 spermareichen Phasen von 3 Ebern wurde das Pelletverfahren dem Einfrieren in Stangenform gegenübergestellt. Vorkühlung und Verdünnung erfolgten wie in Versuchsreihe 4 und 5.

Versuchsreihe 7

Es wurde der Einfluß verschiedener pH-Werte und Verdünnermedien auf die Spermienbewegung nach dem Auftauen untersucht. Die Vorbehandlung der spermareichen Phasen, die Verdünnungsrate, die Glycerinanteile im Tris-Verdünner und die Vorkühlzeit waren bei den als Pellets eingefrorenen Samenverdünnungen die gleichen wie in den Versuchsreihen 5 und 6. Die Verdünnungsvorlage betrug zum Auftauen 3 ml. Die pH-Einstellung auf 6,4 und 7,0 im Tris-Verdünner wurde mit 5 %iger Citratlösung bzw. 1-normaler NaOH vorgenommen.
Es gelangten folgende Verdünner zur Untersuchung:

1. Tris-Verdünner ohne Glycerinzusatz
2. IVT-Verdünner
3. Tris- und IVT-Verdünner im Mischungsverhältnis von 1 + 1.

Das Auftauen der Pellets erfolgte zunächst in 3 ml Tris-Verdünner: 5 - 10 Minuten danach wurde IVT-Verdünner in gleicher Menge hinzugesetzt.

Versuchsreihe 8

In dieser Versuchsreihe wurden 15 konservierte spermareiche Phasen von 2 Ebern in Tris- und Tris-IVT-Verdünnern aufgetaut und nach 15 Minuten erstmals beurteilt. Die Aufrechterhaltung der Vorwärtsbewegung und ihre Bewegungsintensität wurden fortlaufend in viertelstündigen Abständen kontrolliert.

3. Versuchsergebnisse

Das durchschnittliche Volumen der 181 Ejakulate betrug 227 ml. Die zur Untersuchung gelangten spermareichen Phasen hatten einen mittleren pH-Wert von 7,14 und eine Dichte von 0.794 Mill/mm^3.

Versuchsergebnisse der Versuchsreihe 1

Die prozentualen Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien [V] und die Intensität ihrer Bewegungen [I] in Tris-Verdünnern mit steigenden Glycerinkonzentrationen sind in den Tabellen 2 bis 5 aufgeführt. Die Mittelwerte dieser Einzeltabellen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Sie ließen in den verschiedenen Glycerinkonzentrationen keine wesentlichen Unterschiede in den Auftauergebnissen erkennen. Die Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien lagen zwischen 30,8 und 35,0 %. Auch in der Bewertung ihrer Bewegungsintensität ergab sich mit Ansteigen der Glycerinkonzentration kein deutliches Absinken der Bewegungsqualität. Die geringgradigen Motilitätsunterschiede, die sich bei den vorgekühlten Samenportionen in der 5 % glycerinhaltigen Samenverdünnung andeuteten (68,3 % gegenüber 73,3 bzw. 75,8 %), waren nach dem Auftauen nicht mehr zu erkennen.

Tabelle 2

Mittelwerte der Motilität der tiefgefrorenen Spermien unter Verdünneranteilen von 3, 5, 7 und 9 % Glycerin

Glycerinkonz. %	Vor dem Kühlen		Nach dem Kühlen		Auftauergebnisse	
	[V %]	[I]	[V %]	[I]	[V %]	[I]
3	84,2	3,8	73,3	3,5	30,8	2,6
5	84,2	3,8	68,3	3,1	35,0	2,8
7	85,0	3,8	75,8	3,3	33,3	2,8
9	79,2	3,8	73,3	3,5	35,0	2,7

Tabelle 3

Spermareiche Phase + Tris-Verdünner mit 3 % Glycerin. Einzelwerte der prozentualen Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien und ihre Bewegungsintensität vor und nach dem Vorkühlen

Eber-Nr.	Vor dem Kühlen		Nach dem Kühlen		Auftauergebnisse	
	[v %]	[I]	[v %]	[I]	[v %]	[I]
9	90	4	80	4	50	3
9	90	4	80	4	40	3
9	90	4	80	4	30	3
4	60	4	50	4	20	2
4	90	4	80	4	20	2
4	90	3	80	3	30	3
8	70	3	80	2	30	2
8	90	4	80	4	20	3
8	90	4	70	3	30	2
14	80	4	60	3	40	3
14	80	4	70	3	30	3
14	90	4	70	4	30	2
$\bar{x}$:	84,2	3,8	73,3	3,5	30,8	2,6

Tabelle 4

Spermareiche Phase + Tris-Verdünner mit 5 % Glycerin. Einzelwerte der prozentualen Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien und ihre Bewegungsintensität vor und nach dem Vorkühlen

Eber-Nr.	Vor dem Kühlen		Nach dem Kühlen		Auftauergebnisse	
	[v %]	[I]	[v %]	[I]	[v %]	[I]
9	90	4	60	3	50	3
9	90	4	60	3	30	2
9	90	4	70	3	40	2
4	80	4	70	3	20	3
4	90	4	80	2	30	2
4	90	4	80	3	20	3
8	80	3	70	3	30	3
8	70	4	60	4	40	3
8	80	3	60	3	40	3
14	80	4	80	4	50	3
14	80	4	60	3	30	3
14	90	4	70	3	40	3
$\bar{x}$:	84,2	3,8	68,3	3,1	35,0	2,8

Tabelle 5

Spermareiche Phase + Tris-Verdünner mit 7 % Glycerin. Einzelwerte der prozentualen Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien und ihre Bewegungsintensität vor und nach dem Vorkühlen

Eber-Nr.	Vor dem Kühlen		Nach dem Kühlen		Auftauergebnisse	
	[v %]	[I]	[v %]	[I]	[v %]	[I]
9	90	4	80	4	60	3
9	90	4	80	4	40	3
9	90	4	80	4	40	3
4	90	4	80	3	20	3
4	90	3	80	3	10	3
4	70	3	80	2	30	2
8	80	4	80	4	30	2
8	90	4	70	2	20	2
8	90	4	70	3	30	3
14	90	4	70	3	40	3
14	60	3	80	3	60	3
14	90	4	60	4	20	3
$\bar{x}$:	85,0	3,8	75,8	3,3	33,3	2,8

Tabelle 6

Spermareiche Phase + Tris-Verdünner mit 9 % Glycerin. Einzelwerte der prozentualen Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien und ihre Bewegungsintensität vor und nach dem Vorkühlen

Eber-Nr.	Vor dem Kühlen		Nach dem Kühlen		Auftauergebnisse	
	[V %]	[I]	[V %]	[I]	[V %]	[I]
9	80	4	80	3	30	3
9	90	3	80	4	40	3
9	80	4	70	3	50	3
4	80	4	80	4	20	1
4	80	4	70	3	40	2
4	80	4	60	4	40	3
8	80	4	70	3	20	3
8	70	4	80	3	40	2
8	70	4	60	4	30	3
14	80	3	70	4	50	3
14	80	4	80	3	30	3
14	80	3	80	4	30	3
$\bar{x}$:	79,2	3,8	73,3	3,5	35,0	2,7

Versuchsergebnisse der Versuchsreihe 2

Die Versuchsergebnisse zentrifugierter und nicht zentrifugierter spermareicher Phasen mit Merkmalen ihrer Bewegungsintensität sind in der Tabelle 7 dargestellt. Der mittlere Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien betrug bei zentrifugierten und resuspendierten spermareichen Phasen 42,5 % gegenüber 36,7 % bei unzentrifugierten Ejakulatphasen. Auch bei der Bewertung der Bewegungsintensität konnten bei der zentrifugierten Serie mit 3,1 leicht bessere Ergebnisse erzielt werden als mit 2,7 bei der nichtzentrifugierten Gruppe.

Tabelle 7

Auftauergebnisse bei unzentrifugierten und zentrifugierten Ejakulaten

Eber-Nr.	unzentrifugiert		zentrifugiert	
	[V %]	[I]	[V %]	[I]
8	40	2	50	3
8	40	3	40	3
14	50	3	50	4
14	40	3	50	3
15	20	2	20	3
15	40	3	40	3
16	40	2	50	3
16	50	3	50	3
17	40	2	40	3
17	40	3	50	3
18	20	3	30	3
18	20	3	40	3
$\bar{x}$:	36,7	2,7	42,5	3,1

Versuchsergebnisse der Versuchsreihe 3

Die Auftauergebnisse der Samenverdünnungen, mit unterschiedlichen Vorkühlzeiten konserviert, sind in der Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8

Auftauergebnisse bei einer Vorkühlzeit von 5 und 2 1/2 Stunden

Eber-Nr.	Vorkühlzeit von + 25° bis + 10°C in Std.			
	5		2 1/2	
	[v %]	[I]	[v %]	[I]
14	50	3	60	3
14	50	4	70	4
14	60	4	50	3
14	60	3	60	4
14	50	3	70	4
16	50	3	60	3
16	50	3	60	4
16	50	3	70	3
17	40	3	70	4
17	50	3	70	3
17	40	3	60	3
$\bar{x}$:	50	3,2	63,6	3,5

Im Hinblick auf die Auftauergebnisse zeigte sich eine Vorkühlzeit von 2 1/2 Stunden einer 5-stündigen deutlich überlegen. Während bei 5 Stunden der mittlere Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien 50 % betrug, war er bei einer Vorkühlzeit von 2 1/2 Stunden mit 63,6 % um 13,6 % größer. Ein Unterschied, wie er bei den Beweglichkeitsprozentzahlen vorlag, konnte beim Vergleich der Bewegungsintensitäten nicht beobachtet werden. Wurden zimmerwarme Samenverdünnungen ohne Vorkühlzeit eingefroren, kam es zu Auftauergebnissen, die im Mittel weit unter 10 % lagen.

Versuchsergebnisse der Versuchsreihe 4

Die durchschnittlichen Auftauergebnisse der 10 zentrifugierten spermareichen Phasen in den 5 Verdünnungsreihen sind in der Tabelle 9 zusammengestellt. Danach wurde deutlich, daß die Verdünnung 2 + 3 mit 62,5 % vorwärtsbeweglicher Spermien den Verdünnungen 1 + 1 und 2 + 1 deutlich überlegen war. Annähernd gleichgute Auftauergebnisse zeigten die höheren Verdünnungen von 1 + 2 und 1 + 3. Ebenso wie bei den prozentualen Anteilen vorwärtsbeweglicher Spermien konnte das Optimum der Bewegungsintensität von 3,4 in den Verdünnungen 2 + 3, 1 + 2 und 1 + 3 gesehen werden. Auch hier lagen die niedrigsten Bewegungsintensitäten bei den Verdünnungen 1 + 1 und 2 + 1.

Tabelle 9

Mittlere Auftauwerte von 10 in 5 verschiedenen Verdünnungsverhältnissen tiefgefrierkonservierten spermareichen Phasen

Verdünnungsverhältnis	$\bar{x}$ Dichte der Samenverdünnungen (Mill/mm^3)	$\bar{x}$ Auftauergebnisse [V %]	[I]
2 + 1	1.117	17,5	1,6
1 + 1	0.838	38,4	3
2 + 3	0.670	62,5	3,4
1 + 2	0.559	56,6	3,4
1 + 3	0.430	60,0	3,4

Um Zusammenhänge zwischen den Verdünnungsgraden und den Spermiendichten deutlicher darstellen zu können, erschien es notwendig, die 10 spermareichen Phasen nach hohen und niedrigen Ausgangsdichten in 2 Gruppen zu je 5 Ejakulaten

zusammenzufassen. Die Auftauergebnisse dieser Gruppe sind mit den errechneten mittleren Dichten in den Tabellen 10 und 11 dargestellt.

Tabelle 10

Mittlere Auftauwerte von 5 spermareichen Phasen mit einer durchschnittlichen Dichte von 1.475 Mill/mm^3.

Verdünnungs-verhältnis	$\bar{x}$ Dichte der Samenverdünnungen (Mill/mm^3)	$\bar{x}$ Auftauergebnisse [V %]	[I]
2 + 1	0.983	20,0	1,7
1 + 1	0.738	36,7	3,0
2 + 3	0.590	60,0	3,3
1 + 2	0.492	53,3	3,3
1 + 3	0.391	60,0	3,3

Tabelle 11

Mittlere Auftauwerte von 5 spermareichen Phasen mit einer durchschnittlichen Dichte von 1.875 Mill/mm^3.

Verdünnungs-verhältnis	$\bar{x}$ Dichte der Samenverdünnungen (Mill/mm^3)	$\bar{x}$ Auftauergebnisse [V %]	[I]
2 + 1	1.250	15	1,5
1 + 1	0.938	40	3
2 + 3	0.750	65	3,5
1 + 2	0.626	60	3,5
1 + 3	0.469	60	3,5

Dabei zeigte sich, daß eine Dichte von 0.750 Mill/mm^3 bei der Verdünnung von 2 + 3 mit 65 % vorwärtsbeweglicher Spermien und einer Bewegungsintensität von 3,5 die besten Auftauergebnisse ergab (Tab. 11). Die annähernd gleichgroße Dichte, jedoch bei einer Verdünnung von 1 + 1, erbrachte nur eine mittlere Spermienvorwärtsbewegung von 36,7 % bei einer ebenfalls schlechteren Bewegungsintensität (Tab. 10). Wurde durch eine Erhöhung des Verdünneranteils (1 + 2 u. 1 + 3) die Spermiendichte vermindert, dann konnte weder im Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien noch in deren Bewegungsintensität eine Verschlechterung beobachtet werden.

Versuchsergebnisse der Versuchsreihe 5

Die Ergebnisse der 30 konservierten spermareichen Phasen sind nach den Versuchsebern mit ihren Mittelwerten in der Tabelle 12 zusammengestellt.
Danach betrug der durchschnittliche Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien aller 30 Ejakulatfraktionen bei einer mittleren Dichte von 0.623 Mill/mm^3 56,3 % bei einer mittleren Bewegungsintensität von 3,3. Die Durchschnittswerte der 3 Ebergruppen wichen weder in der Quantität noch in der Qualität ihrer Bewegung wesentlich voneinander ab.

Tabelle 12

Durchschnittliche Auftauwerte der im Verdünnungsverhältnis 2 + 3 tiefgefrierkonservierten spermareichen Phasen

Eber-Nr.	Anzahl der Ejakulate	Dichte der spermareichen Phasen [Mill/mm^3]	Verdünnungsgrad	Spermiendichte der Samenverd. [Mill/mm^3]	Auftauergebnisse [V %]	[I]
14	12	1.431	2 + 3	0.573	59,3	3,4
16	9	1.675	2 + 3	0.670	58,9	3,2
17	9	1.608	2 + 3	0.643	51,1	3,2
$\bar{x}$:	30	1.558	2 + 3	0.623	56,3	3,3

Versuchsergebnisse der Versuchsreihe 6

Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen von Konservierungen in Pellet- und Stangenform sind in Tabelle 13 zusammengestellt. Danach war bei einer mittleren Samendichte von 0.614 Mill/mm^3 der prozentuale Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien bei der als Pellets eingefrorenen Probenreihe mit durchschnittlich 61,3 % um 10 % deutlich besser als die in Stangenform konfektionierten Samenverdünnungen (51,3 %). Weniger deutlich war der Unterschied in der Bewegungsintensität. Mit 3,3 lag der Wert bei der Pelletreihe nur unbedeutend höher als 3,1 bei der in Stangenform eingefrorenen Samenverdünnung.

Tabelle 13

Vergleichende Auftauergebnisse bei Pellet- und Stangenkonservierung

Eber-Nr.	Dichte der Samenverdünnungen (Mill/mm^3)	Auftauergebnisse			
		Pellets		Stangenform	
		[V %]	[I]	[V %]	[I]
14	0.590	60	3	60	3
14	0.590	60	4	50	4
14	0.490	30	2	30	2
14	0.750	50	3	40	3
14	0.590	60	3	50	2
14	0.420	70	4	60	4
14	0.590	70	4	60	4
16	0.750	60	3	50	3
16	0.670	60	3	40	3
16	0.750	70	4	60	4
16	0.625	60	3	50	3
17	0.750	70	3	50	2
17	0.590	60	3	40	3
17	0.612	70	4	70	4
17	0.450	70	3	60	3
$\bar{x}$:	0.614	61,3	3,3	51,3	3,1

Versuchsergebnisse der Versuchsreihe 7

Der Einfluß der Verdünner-pH-Werte 6,4 und 7,0 auf die Auftauergebnisse der in dieser Versuchsreihe eingefrorenen Samenverdünnungen ist in den Tabelle 14 - 16 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, daß beim Auftauen von tiefgefrorenem Samen in Tris-Vorlage die Spermien der einzelnen Eber in verschiedenen pH-Bereichen ihre besten Beweglichkeitsprozentzahlen aufweisen. Während der Eber 14 (Tab. 14) im Mittel von 6 Ejakulaten bei pH 6,4 einen Anteil von vorwärtsbeweglichen Spermien von 63,3 % und eine Bewegungsintensität von 3,5 zeigte, lagen die Werte bei pH 7,0 mit 50 % und 2,8 deutlich schlechter. Anders dagegen beim Eber 17 (Tab. 16). Hier lag das Auftauoptimum sowohl hinsichtlich des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien, als auch ihrer Bewegungsintensität mit 53,3 % und 3,0 bei pH 7,0. Bei pH 6,4 konnten nur 38,3 % vorwärtsbewegliche Spermien mit einer Bewegungsintensität von 2,7 beobachtet werden.

Die Ejakulate bei Eber 16 (Tab. 15) hatten die meisten vorwärtsbeweglichen Spermien mit 61,7 % bei pH 6,4 gegenüber 53,3 % bei pH 7,0. Die bessere Bewegungsintensität von 3,3 wurde bei pH 7,0 gemessen.

Die Ergebnisse über den Einfluß von Tris- und IVT-Verdünner als Auftauvorlage sind in der Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 14

Auftauergebnisse in Vorlagen mit den pH-Werten 6,4 und 7,0

Nr.	Eber	Auftauergebnisse pH 6,4 [V %]	pH 6,4 [I]	pH 7,0 [V %]	pH 7,0 [I]
1	14	70	3	60	3
2	14	70	4	50	3
3	14	60	4	50	3
4	14	70	4	50	3
5	14	60	3	50	3
6	14	50	3	40	2
$\bar{x}$:		63,3	3,5	50,0	2,8

Tabelle 15

Auftauergebnisse in Vorlagen mit den pH-Werten 6,4 und 7,0

Nr.	Eber	Auftauergebnisse pH 6,4 [V %]	pH 6,4 [I]	pH 7,0 [V %]	pH 7,0 [I]
7	16	50	3	50	3
8	16	70	2	60	3
9	16	70	2	60	4
10	16	70	3	60	3
11	16	50	3	50	4
12	16	60	3	40	3
$\bar{x}$:		61,7	2,7	53,3	3,3

Tabelle 16

Auftauergebnisse in Vorlagen mit den pH-Werten 6,4 und 7,0

Nr.	Eber	Auftauergebnisse			
		pH 6,4		pH 7,0	
		[V %]	[I]	[V %]	[I]
13	17	40	3	50	3
14	17	40	2	60	3
15	17	20	2	40	3
16	17	40	3	70	3
17	17	50	3	50	3
18	17	40	3	50	3
$\bar{x}$:		38,3	2,7	53,3	3,0

Tabelle 17

Auftauergebnisse in Tris- und IVT-Vorlage

Eber	Tris		IVT	
	[V %]	[I]	[V %]	[I]
14	70	4	30	2
	60	3	10	1
	60	3	10	1
16	50	2	20	1
	60	3	40	3
	50	3	30	2
	60	3	30	2
17	70	3	30	1
	50	3	30	1
	50	3	20	1
$\bar{x}$:	64,0	3,0	25,0	1,5

Danach erbrachte das Auftauen der Pellets im Tris-Verdünner mit 64,0 % vorwärtsbeweglicher Spermien und einer Bewegungsintensität von 3 die besten Ergebnisse verglichen mit der IVT-Vorlage, bei der nur ein Anteil von 25 % Vorwärtsbewegung mit einer Intensität von 1,5 erkennbar war.
In der Tabelle 18 sind die Auftauergebnisse im Tris-Verdünner denen im Tris-IVT-Gemisch gegenübergestellt. Auch bei dieser Versuchsanordnung war die Überlegenheit des reinen Tris-Verdünners offenkundig. Nach anfänglich gleicher Spermienmotilität war nach Zusatz des IVT-Verdünneranteils eine deutliche Verschlechterung des Anteils der vorwärtsbeweglichen Spermien und deren Bewegungsintensität vorhanden.
Bei Auftauversuchen in ultrazentrifugiertem Plasma der gleichen Ejakulate konnte eine Zusammenballung der Spermien mit schnellem Motilitätsverlust beobachtet werden. Physiologische Kochsalzlösung erbrachte eine deutlich schlechtere Spermienbewegung als ein IVT-Verdünner.

Tabelle 18

Auftauergebnisse in Tris- und Tris-IVT-Verdünner

Eber-Nr.	Tris		Tris + IVT	
	[V %]	[I]	[V %]	[I]
14	70	3	70	2
	60	3	60	2
16	50	3	30	3
	50	3	50	2
17	60	3	30	2
	70	3	60	3
	70	3	70	2
$\bar{x}$:	61,4	3,0	52,8	2,3

Versuchsergebnisse der Versuchsreihe 8

In der Tabelle 19 sind die Auftauergebnisse der 15 Ejakulate von 3 Ebern, in 15-minütigen Abständen bei + 39°C beurteilt, mit ihren Mittelwerten vergleichend dargestellt.

Die Werte zeigen, daß im Tris-Verdünner 30 Minuten nach dem Auftauen ein nahezu gleichmäßiger Abfall der Spermienvorwärtsbewegung eintrat. Nach 135 Minuten war jegliche Bewegung erloschen. Die Bewegungsintensitäten verhielten sich entsprechend den Beweglichkeitsprozentzahlen.

Im Tris-IVT-Verdünner lag der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nach Zusatz der IVT-Lösung etwa 10 % unter den vergleichbaren Tris-Verdünnerwerten. Die Spermienmotilität hielt sich für ca. 60 Minuten mit einer geringgradigen Zunahme der Intensität konstant. Erst dann konnte, wie beim Tris-Verdünner, ein kontinuierlicher Abfall der Spermienmotilität beobachtet werden. Nach 165 Minuten war keine Vorwärtsbeweglichkeit mehr vorhanden.

Wurden die aufgetauten Samenproben bei Zimmertemperatur gelagert, so konnten noch nach 12 Stunden durch Schütteln und Erwärmen der Proben auf + 39°C 10 bis 20 % der Spermien mit mäßiger Bewegungsintensität zur Vorwärtsbewegung reaktiviert werden.

Tabelle 19

Mittelwerte von 15 Ejakulaten von 3 Ebern bei 15-minütiger Kontrolle der Motilität

Zeit d. Beurteilung t min		0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
Tris	V %	60,0	58,7	59,3	44,7	31,4	29,3	18,7	11,3	2,7	0			
	I	3,6	3,6	3,0	2,4	2,0	1,6	1,4	1,0	0,4	0			
Tris + IVT	V %		52,7	54,0	50,7	51,3	52,0	46,0	38,0	29,3	16,0	4,7	1,3	0
	I		3,2	3,4	3,4	3,5	3,3	3,0	2,6	1,9	1,8	1,2	0,3	

D. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 181 spermareiche Phasen gewonnen und bei Verwendung des Tris-Verdünners unter verschiedenen Kriterien in 8 Versuchsreihen in Pellet- oder Stangenform eingefroren und aufgetaut. Ferner wurden Methoden der Konfektionierung verglichen und Verdünnerlösungen auf ihre Eignung als Auftaumedien geprüft.
Durch die Versuchsergebnisse konnten Aussagen über den Einfluß des Glycerins, des Zentrifugierens, des Vorkühlens und der Verdünnungsverhältnisse auf die Eberspermien gemacht werden.

In der Spermakonservierung bei niedrigen Temperaturen ist das Glycerin durch seine schützende Funktion beim Einfrieren der Spermien das Mittel der Wahl. In der Literatur reichen die Angaben über die Zusatzmenge von Glycerin zur Samenverdünnung von 3,2 % (GROVE u. Mitarb., 1968) bis zu 25 % (WERKMANN, 1959), wobei überwiegend Glycerinkonzentrationen von 10 % und niedriger empfohlen werden (POLGE, 1956, 1959; SETTERGREN, 1958; HOFFMANN, 1959; HESS u. Mitarb., 1960; BAIER, 1962; KING u. MCPHERSSON, 1966; ROH LOFF, 1967). Die in dieser Arbeit angegebenen Glycerinmengen bezogen sich auf das Verdünnervolumen und lagen in der Endkonzentration des verdünnten Samens je nach Anteil und Verdünnungsverhältnis zwischen 2,4 und 7,2 %. Bei Glycerinanteilen in diesem Bereich konnten in der Versuchsreihe 1 keine wesentlichen Unterschiede der Auftauergebnisse beobachtet werden. Ebenso wie bei GROVE und Mitarbeitern (1968) konnten gute Auftauergebnisse bei Glycerinendkonzentrationen unter 5 % erzielt werden.

Die bei den Ergebnissen der Versuchsreihe 2 beobachtete leichte Erhöhung des prozentualen Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien und deren Bewegungsintensität bei zentrifugierten gegenüber unzentrifugierten spermareichen Phasen, kam den Bestrebungen entgegen, möglichst dichte Samenverdünnungen ohne Qualitätsverlust herzustellen. ROY (1959), WERKMANN (1959), HOFFMANN (1959) und BAIER (1962) erzielten

ebenfalls bessere Ergebnisse mit zentrifugiertem Samen.

BIALY und SELF (1959) und SELF (1959) wiesen allerdings auf den schädigenden Einfluß des Zentrifugierens auf die Eberspermien hin.

Die Verkürzung der Vorkühlzeit von 5 auf 2 1/2 Stunden bei gleicher Endtemperatur von + 10°C zeigte deutlich bessere Auftauergebnisse. Die damit einhergehende Beschleunigung des Temperaturabfalls wirkte sich positiv auf die Spermien aus. Es kann vermutet werden, daß durch die Verkürzung der Zeit vor dem Einfrieren ein übermäßiger Energieverlust der Spermien vermieden wurde, woraus die guten Auftauergebnisse resultierten. Die Wirksamkeit der verkürzten Vorkühlzeit konnte dadurch noch gesteigert werden, daß der gesamte Glycerinanteil beim Verdünnen des Samens vor dem Kühlen zugesetzt wurde und somit Vorkühlzeit gleich Glycerinanpassungszeit war.
BADER (H., 1964) und KING und MCPHERSSON (1966) konservierten optimal bei Vorkühlzeiten von 3 1/2 bis 4 1/2 bzw. 4 Stunden. Die den Glycerinanteil enthaltenden Samenverdünnungen wurden bei den genannten Autoren auf eine Vorkühltemperatur von 5°C gebracht, während in den vorliegenden Versuchen ein Vorkühlen auf + 10°C auszureichen schien. Wurde wie bei HOFFMANN (1959) ohne Vorkühlzeit eingefroren, waren die Auftauergebnisse unbefriedigend.

Die Versuchsreihe 4 ergab, daß Verdünnungen im Verhältnis 2 + 3 bei einer Spermiendichte bis 0.750 Mill/mm^3 optimale Auftauergebnisse ergaben, während die gleiche Dichte im Verdünnungsverhältnis 1 + 1 deutlich schlechter war. Es ist zu vermuten, daß auch die Dichte und die Glycerinkonzentration Einfluß auf die Auftauergebnisse haben können. Deutlicher schien sich jedoch ein Unterschreiten eines benötigten "Minimalverdünnervolumens" auszuwirken, d. h. eine zentrifugierte spermareiche Phase von einer Dichte bis 1.600 Mill/mm^3 muß zumindest mit dem 1 1/2fachen ihres Volumens verdünnt werden.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe 4 zeigten, daß Samenverdünnungen mit Spermienkonzentrationen von 0.500 bis 0.800 Mill/mm^3 eingefroren werden konnten, und somit günstige Voraussetzungen für die Pellet- und Stangenkonservierung bildeten. So konnten Samenverdünnungen mit etwa 2 Mill. Spermien pro Pellet oder sogar 2 Mrd.pro Stange eingefroren werden.

Vergleichende Untersuchungen von Auftauergebnissen der in Versuchsreihe 6 in Pellet- oder Stangenform konservierten Samenverdünnungen erbrachten einen 10 % höheren Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien zugunsten der Pellets. Das dürfte auf die größere zu durchfrierende Samenverdünnungsmasse der Stangen zurückzuführen sein. LEIPNITZ (1966) konnte beim Einfrieren von Bullensamenverdünnungen in Pelletform feststellen, daß bei einer Verkleinerung der Pellets der Anteil der vorwärtsbeweglichen Spermien nach dem Auftauen größer wurde.

Die in den Versuchsreihen 7 und 8 ermittelten Werte zeigten eine deutliche Überlegenheit des Tris-Verdünners als Auftauvorlage gegenüber dem IVT- und dem Tris-IVT-Verdünner. Der pH-Wert hatte bei einigen Ebern einen erheblichen Einfluß auf die Anzahl der vorwärtsbeweglichen Spermien und deren Bewegungsintensität.

In der Versuchsreihe 8 wurden die aufgetauten Proben im 15 Minuten-Abstand auf ihre Motilität überprüft. Eine befriedigende Beweglichkeit konnte in keinem Verdünner bei + 39°C länger als 90 Minuten erhalten bleiben. Bei Zimmertemperatur hingegen waren noch nach 12 Stunden bewegliche Spermien zu beobachten. Die Vermutung liegt nahe, daß das Stoffwechselvermögen der Spermien durch den Tiefgefrierprozeß geschädigt wird und durch Verminderung der Temperatur verbliebene Energien langsamer verbraucht werden.

E. Zusammenfassung

Durch die Versuche sollten einige Kriterien der Ebersperma-tiefgefrierung untersucht werden. 181 spermareiche Phasen wurden in 8 Versuchsreihen unter Verwendung des Tris-Verdünners nach Vorkühlen auf + 10°C in Pellet- oder Stangenform über Trockeneis in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Anzahl vorwärtsbeweglicher Spermien und ihre Bewegungsaktivität vergleichend geprüft. Dabei zeigte sich:

1. Spermareiche Phasen sind als Samenverdünnungen mit einer Glycerinendkonzentration von 2,4 bis 7,2 ohne wesentliche Unterschiede der Auftauergebnisse erfolgreich zu konservieren.

2. Eine Anreicherung der spermareichen Phasen durch Zentrifugieren (3 min bei 2000 U/min) wirkte sich vorteilhaft auf die Motilität nach dem Tiefgefrieren aus.

3. Durch Verkürzung der Vorkühlzeit von 5 auf 2 1/2 Stunden mit einer Endtemperatur von + 10°C läßt sich eine erhebliche Verbesserung der Auftauwerte erzielen.

4. Zentrifugierte spermareiche Phasen lassen sich im Verdünnungsverhältnis 2 + 3 mit einer Spermiendichte von 0.750 Mill/mm^3 tiefgefrieren und mit bis zu 70 % vorwärtsbeweglichen Spermien und einer guten Bewegungsintensität auftauen.

5. Es wurden Samenverdünnungen mit einer Spermiendichte bis 0.750 Mill/mm^3 in Pellet- und Stangenform hergestellt. Die Auftauergebnisse der Pellets waren um 10 % besser als die der Stangen.

6. Die besten Auftauergebnisse wurden mit Tris-Verdünner als Auftauvorlage erzielt. Der IVT-Verdünner und der Tris + IVT-Verdünner erzielten deutlich schlechtere Ergebnisse.

7. Die Überlebenszeit der Spermien in aufgetautem Zustand betrug bei + 39°C maximal 165 Minuten im Tris-IVT-Verdünner. Im Tris-Verdünner konnte nur eine Überlebenszeit von 120 Minuten erreicht werden. Eine befriedigende Motilität konnte bis maximal 90 Minuten beobachtet werden.

F. Literaturverzeichnis

1. AAMDAL, J. u. L. HÖGSET (1957) — Artificial insemination in swine. J. Amer. Vet. Med. Ass. 131, 59-64

2. BADER, B. (1964) — Versuche zur Tiefgefrierkonservierung von Ebersamen. Vet. med. Diss. Hannover

3. BADER, H. (1964) — Untersuchungen über den Einfluß unterschiedlicher Abkühlgeschwindigkeiten beim Tiefgefrieren von Ebersperma auf die Bewegungsaktivität der Samenzellen. Vet. med. Diss. Hannover

4. BAIER, W. (1962) — Erfahrungen in der künstlichen Besamung des Hausschweines einschließlich der Verwendung von Tiefkühlsamen. Zootec. Vet. 17, 94-99

5. BANE, A. (1959) — Some results of studies on the semen of young boars and on artificial insemination in pigs. Ann. zootech. 8, 15-20

6. BIALY, G. u. H.L. SELF (1959) — The storage potential and citric acid content of fractioned ejaculates of the boar. J. Anim. Sci. 18, 374-382

7. DUKELOW, W.R. u. E.F. GRAHAM (1962) — Freezing porcine semen. J. Anim. Sci. 21, 1020-1021

8. DU MESNIL DU BUISSON, F. (1957) — Conservation du sperme de verrat sans dilution; conditions d'examen. Ann. Zootech. 4, 391-399

9. DU MESNIL DU BUISSON, F. u. R. JONDET (L961) — Utilisation du CO_2 dans l'insémination porcine. IV. Internat. Congr. Anim. Reprod., Den Haag

10. EIBL, K. u. K. WETTKE (1964) A. I. of pigs using CO_2-inactivated boar semen. Vet. Rec. 76, 856-858

11. FOOTE, R.H., D.C. YOUNG, R.A. TURKHEIMER u. R. W. BRATTON (1959) Collection, preservation and artificial insemination of boar semen. Ann. Zootech. 8, 27-30

12. GROVE, D., W. BOLLWAHN u. R. MAHLER (1968) Versuche zur Gewinnung und Tiefgefrierkonservierung von Nebenhodenschwanzsperma beim Eber. Dtsch. tierärztl. Wschr. 75, 35-38

13. HEIDRICH, H.J., D. ROHLOFF u. U. v. PUSCH (1964) Beitrag zur Eberspermakonservierung. CO_2 - Konservierung der spermareichen Hauptphase in eidotterhaltigen Verdünnern. Dtsch. tierärztl. Wschr. 71, 662-664

14. HESS, E.A., H.S. TEAGUE, T.M. LUDWICK u. R.C. MARTIG (1957) Swine can be bred with frozen semen. Ohio Farm and Home Research 42, 309, 100

15. HESS, E.A., T.M. LUDWICK u. H.S. TEAGUE (1960) Motility of boar spermatozoa as influenced by semen freezing procedures. J. Anim. Sci. 19, 926-931

16. HOF, H. (1956) Die künstliche Besamung des Schweines im Schrifttum. Vet. med. Diss. Gießen

17. HOFFMANN, H. (1959) Versuche zur Frostkonservierung des Ebersamens. Vet. med. Diss. München

18. KING, G.J. u. J.W. MCPHERSSON (1966) Boar semen studies. Laboratory evaluation of processing phases. Can. j. Comp. Med. Vet. Sci. 30, 332-335

19. KVASNITZKI, A.V. (1959) Méthode fractionée d'insemination artificielle des truies. Ann. Zootech. 8, 43-58

20 LEIPNITZ, CHR. (1966) Ein Beitrag zur Tiefkühlung von Rindersperma in Pillenform. Dtsch. tierärztl. Wschr. 73, 284-285

21. LIESS, J. u. D. GROVE (1963) Beitrag zur Inaktivierung von Ebersamen durch Begasung des unverdünnten Ejakulates mit Kohlendioxyd. Dtsch. tierärztl. Wschr. 70, 433-437

22. MELROSE, D.R. u. C. O'HAGAN (1959) Some observations on the collecting of boar semen and its use for artificial insemination. Ann. Zootech. 8, 69-79

23. NAGASE, H. u. T. NIWA (1963) Studies on deep-freezing techniques for bull semen. III. Deep-freezing of bull semen in tablet form. Jap. J. Anim. Reprod. 9, 73-76

24. NAGASE, H. u. T. NIWA (1964) Deep-freezing bull semen in concentrated pellet form. I. Factors affecting survival of spermatozoa. V. Intern. Congr. Anim. Reprod. and Artificial Insemination, Section III, 410-415

25. NIWA, T. (1961) Researches and practies in the artificial insemination of pigs. Proc. IV. Intern. Congr. Anim. Reprod. Den Haag, 83-115

26. NIWA, T., S. ITO, A. KUDO, A. MIZUHO u. A. SOEJIMA (1959) — Techniques of artificial insemination with swine in Japan. Ann. Zootech. 8, 97-103

27. NIWA, T., R.J. GERRITS u. E.F. GRAHAM (1962) — Deep-freezing of boar semen. J. Anim. Sci. 21, 1027-1028

28. POLGE, C. (1956) — Artificial insemination in pigs. Vet. Rec. 68, 62-76

29. POLGE, C. (1959) — Some experiments of preservation of boar seman. Ann. Zootech. 8, 113-120

30. POLGE, C., A.U. SMITH u. A.S. PARKES (1949) — Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration in low temperatures. Nature, London 164, 666

31. ROHLOFF, D. (1964) — Versuche zur Konservierung von Ebersperma mit Hilfe der CO_2-Inaktivierung unter Verwendung verschiedener Verdünner. Vet. med. Diss. FU Berlin

32. ROHLOFF, D. (1967) — Tiefgefrierung von Ebersperma in Pelletform bei - 196°C. Zuchthyg. 2, 75-77

33. ROTHE, K. (1960) — Versuche zur Verdünnung und Konservierung von Ebersperma. Zuchthyg. 4, 173-179

34. ROTHE, K. (1963) — Die künstliche Besamung beim Schwein. Arch. Exper. Vet. Med. 16, 957-1089

35. ROWSON, L.E.A. u. C. POLGE (1953) — Storage of bull semen at - 79°C and fertility results for up to 12 months. Vet. Rec. 65, 677-679

36. ROY, A. (1955) Storage of boar and stallion spermatozoa in glycine-egg-yolk medium. Vet. Rec. 67, 330-331

37. SELF, H.L. (1959) The problem of storing and inseminating boar semen. Ann. Zootech. 8, 121-134

38. SETTERGREN, I. (1958) Experiments on the deep-freezing of boar semen at - 79°C. VIII. Nordiska Veterinärmötet, Helsingfors, Sekt. D, rapport 26

39. SMIDT, D. (1964) Untersuchungen zur künstlichen Besamung beim Schwein. Dtsch. tierärztl. Wschr. 71, 369-375 u. 408-410

40. SMITH, A.U. u. C. POLGE (1950) Storage of bull spermatozoa at low temperatures. Vet. Rec. 62, 115

41. SPREMBERG, K. (1963) CO_2-Konservierung von Ebersperma. Vet. med. Diss. HU Berlin

42. VAN DEMARK, N.L. u. U.D. SHARMA (1957) Preliminary fertility results from the preservation of bovine semen at room temperature. J. Dairy Sci. 40, 438-439

43. WERKMANN, U.F. (1959) Bericht über eine Studienreise nach Texas (USA). Tijdschr. Diergenesk. 84, 1189-1192

Für die Übertragung des Themas und die jederzeit gewährte Hilfe danke ich Herrn Professor Dr. H.J. Heidrich.

Herrn Oberassistent Dr. D. Rohloff danke ich für die gegebenen Anregungen und für die freundliche Unterstützung und Beratung während der Versuche und bei der Abfassung der Dissertation.

Lebenslauf

Am 18. September 1941 wurde ich, Günther Allmeling, als Sohn des prakt. Arztes Dr. med. Günther Allmeling und seiner Ehefrau Edith Allmeling, geb. Kruse, in Hamburg geboren.
In Geesthacht/Elbe besuchte ich 4 Jahre die Grundschule und legte dann 1962 am Ludwig - Meyn - Gymnasium in Uetersen/Holst. die Reifeprüfung ab. Nach Ableistung der Wehrpflicht begann ich im Wintersemester 1963 das Studium der Veterinärmedizin in Hannover, um 1966, nach Ablegen der Tierärztlichen Vorprüfung, an die Freie Universität zu wechseln, wo ich 1969 mein Studium mit dem Staatsexamen beendete. Am 9. Juli 1969 bekam ich die Approbation als Tierarzt.